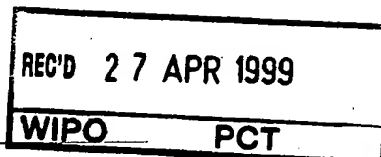


09/647780



E D V



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 AVR. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLESIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

07/14/80

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30.

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

08 AVR 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 04389 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

75 08 AVR 1998

1

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
2 Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

BIF 98/0064

53-20-14-20

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

de l'invention (200 caractères maximum)

Nouvelle métalloprotéase membranaire NEP II et son utilisation pour le criblage
d'inhibiteurs utiles en thérapie.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)

Forme juridique

Nationalité (s)

Française

Adresse (s) complète (s)

101 Rue de Tolbiac, 75013 PARIS

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

CABINET LAVOIX

M. NONCHENT n° 92.1179

M. Nonchenty

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris-Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 04389

TITRE DE L'INVENTION : Nouvelle métalloprotéase membranaire NEP II et son utilisation pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE
(INSERM)
101 Rue de Tolbiac, 75013 PARIS FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

OUMET Tanja
3 rue Jules César 75012 PARIS FRANCE

GROS Claude
31 rue de Flers 75015 PARIS FRANCE

ROSE Christiane
20 Place Henri IV 78320 LE MESNIL ST DENIS FRANCE

BONHOMME Marie-Chantal
910 Lapointe St-Laurent, P.Q. H4L 1J8 CANADA

FACCHINETTI Patricia
31 Avenue du Général de Gaulle 94420 LE PLESSIS TREVISE FRANCE

SCHWARTZ Jean-Charles
9 Villa Seurat 75014 PARIS FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 14 Janvier 1999

CABINET LAVOIX
M. MONCHENY n° 92.1179

N. Moncheny

La présente invention a pour objet une nouvelle métalloprotéase membranaire appelée NEP II et son utilisation, notamment pour le criblage d'inhibiteurs utiles en thérapie.

5 Les métalloprotéases membranaires telles que le néprilysine (NEP I, EC 3.4.24.11) jouent un rôle important dans l'activation ou l'inactivation des messagers peptidiques neuronaux ou hormonaux. Leur inhibition sélective par des composés synthétiques a déjà conduit à des médicaments couramment utilisés en thérapie ou en cours de développement clinique, notamment
10 dans les domaines gastroentérologique (Baumer et coll., Gut, 1992, 33 : 753-758) et cardiovasculaire (Gros et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88 : 4210-4214). L'isolement des ADNc de gènes de nouvelles métalloprotéases apparentées est de nature à permettre le développement de nouvelles classes d'inhibiteurs spécifiques à applications thérapeutiques prometteuses. C'est ainsi
15 que le clonage et l'expression du gène de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Xu et coll., Cell, 1994, 78 : 473-485) a permis la mise au point d'inhibiteurs potentiellement utiles dans certaines affections cardiovasculaires.

20 Les travaux des inventeurs ayant conduit à la présente invention ont mis en évidence une nouvelle métalloprotéase membranaire appartenant à la famille ECE/NEP/Kell (Lee S. et coll., 1991, PNAS 88(14):6353-57), qu'ils ont appelée NEP II.

La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé dont
25 la séquence d'acides aminés est choisie parmi la séquence SEQ ID n°2, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n°2, ou un fragment biologiquement actif de ladite séquence SEQ ID n°2, ledit polypeptide isolé étant désigné par «NEP II ».

La séquence SEQ ID n° 2 est la séquence d'acides aminés de
30 NEP II identifiée chez le rat.

Par polypeptide "dérivé", on entend tout polypeptide résultant d'une modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence SEQ ID n° 2, c'est-à-dire par mutation, délétion, addition, substitution et/ou modification

chimique d'au moins un acide aminé, ou toute isoforme ayant une séquence identique à la séquence SEQ ID n° 2 mais contenant au moins un acide aminé sous la forme D.

Par polypeptide "homologue", on entend plus particulièrement tout polypeptide isolable chez d'autres espèces de mammifères que le rat, et notamment chez l'homme.

Lesdits polypeptides homologues présentent préférentiellement une homologie de séquence supérieure à 80 %, de préférence encore supérieure à 85 %, avec la séquence SEQ ID n° 2 complète, l'homologie étant particulièrement élevée dans la partie centrale dudit polypeptide.

Lesdits polypeptides dérivés, homologues ou les fragments polypeptidiques du polypeptide de séquence SEQ ID n° 2 sont biologiquement actifs, c'est-à-dire présentent des propriétés biologiques identiques ou similaires des propriétés biologiques du polypeptide NEP II de séquence SEQ ID n° 2, à savoir une activité métalloprotéasique.

Les fragments polypeptidiques préférés comprennent la séquence du site actif responsable de la liaison de l'atome de zinc indispensable à la catalyse. Ce site actif a été identifié comme englobant les résidus HEX_1X_2H , X_1 et X_2 représentant des acides aminés variables. Il s'agit en particulier de la séquence HEITH (acides aminés 608 à 612 de la séquence SEQ ID n° 2) dans le polypeptide NEP II chez le rat.

La présente invention a également pour objet une séquence nucléotidique isolée comprenant une séquence choisie parmi la séquence SEQ ID n°1, une séquence dérivée ou homologue de ladite séquence SEQ ID n°1, ou leurs séquences complémentaires.

La séquence SEQ ID n° 1 est la séquence d'ADNc comprenant la phase codante pour NEP II identifiée chez le rat.

Par séquence nucléotidique "dérivée", on entend toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide dérivé de NEP II tel que défini précédemment, c'est-à-dire une séquence résultant d'une modification de la séquence SEQ ID n° 1, notamment par mutation, délétion, addition ou substitution d'au moins un nucléotide. Sont en particulier comprises les

séquences dérivées de la séquence SEQ ID n° 1 par dégénérescence du code génétique.

Par séquence "homologue", on entend plus particulièrement toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide NEP II homologue du polypeptide NEP II de séquence SEQ ID n° 2 chez d'autres espèces de mammifères que le rat, et notamment chez l'homme.

Une telle séquence homologue présente préférentiellement une homologie supérieure à 70 %, de préférence encore supérieure à 75 %, avec la séquence SEQ ID n° 1, l'homologie étant particulièrement élevée dans la partie centrale de la séquence codant pour le polypeptide NEP II.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées pour la production d'une protéine recombinante NEP II selon l'invention, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier.

Un système efficace de production d'une protéine recombinante nécessite de disposer d'un vecteur, par exemple d'origine plasmidique ou virale, et d'une cellule hôte compatible.

L'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes, comme les bactéries, ou eucaryotes, comme par exemple des levures, des cellules d'insectes, de mammifères, telles que les cellules CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ou tout autre système avantageusement disponible.

Le vecteur doit comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que les régions appropriées de régulation de la transcription. Il doit pouvoir être intégré dans la cellule et peut éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les

clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation.

Des exemples de vecteurs d'intérêt sont les plasmides pcDNA 3.1, PCR2.1 (Invitrogen), ou pMbac (Stratagene).

5 L'invention vise les vecteurs de clonage et/ou d'expression contenant une séquence nucléotidique selon l'invention, et vise en outre les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules
10 dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Ces cellules sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide recombinant selon l'invention.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous
15 forme recombinante est elle-même comprise dans la présente invention, et se caractérise en ce que l'on cultive les cellules transfectées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du
20 métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées séparément ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou de sérum polyclonal, etc.

25

La présente invention a également pour objet les sondes nucléotidiques, capables de s'hybrider fortement et spécifiquement avec une séquence d'acide nucléique, d'un ADN génomique ou d'un ARN messager, codant pour un polypeptide selon l'invention. Les conditions d'hybridation
30 appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier (Sambrook et al., 1989), de préférence à des conditions de forte stringence, c'est-à-dire des conditions de température comprises entre (T_m moins 5°C) et (T_m moins 15°C) et de

préférence encore, à des conditions de température comprises entre T_m et (T_m moins 10° C) (forte stringence), T_m étant la température théorique de fusion, définie comme étant la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent.

Les sondes préférées sont notamment les sondes oligonucléotidiques choisies parmi les séquences :

- SEQ ID n°3 ;
- SEQ ID n°4 ;
- SEQ ID n°5 ;
- 10 - SEQ ID n°6 ;
- SEQ ID n°7 ;
- SEQ ID n°8 ;
- SEQ ID n°9 ;
- SEQ ID n°10 ;
- 15 - SEQ ID n°11 ;
- SEQ ID n°12 ;
- SEQ ID n°13 ;
- SEQ ID n°14 ;
- SEQ ID n°15 ;
- 20 - SEQ ID n°16 ;
- SEQ ID n°17 ;
- SEQ ID n°18 ;
- SEQ ID n°19 .

De telles sondes sont utiles pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction en chaîne par polymérase) ou toute autre variante de celle-ci.

De telles sondes sont également utiles dans un procédé de détection de l'expression du polypeptide NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à :

- préparer l'ARN dudit échantillon ou desdites cellules ou dudit tissu;

- mettre en contact ledit ARN obtenu avec au moins une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique selon l'invention, ladite sonde pouvant être notamment une sonde oligonucléotidique de séquence SEQ ID n° 3 à SEQ ID n° 19 ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec ladite sonde indicatrice de l'expression du polypeptide NEP II.

L'invention a également pour objet les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'un polypeptide selon l'invention administré à un animal, et sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention. L'invention a en outre pour objet l'utilisation de ces anticorps pour la purification ou la détection d'un polypeptide NEP II dans un échantillon biologique.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre la protéine NEP II, produite par exemple par recombinaison génétique suivant la méthode décrite ci-dessus, selon les modes opératoires usuels.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, 1975, vol. 256, pp 495-497).

Les anticorps peuvent être des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués.

Les anticorps selon l'invention sont particulièrement utiles pour détecter la présence de NEP II.

La présente invention a donc pour objet un procédé de détection immunologique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un anticorps détectable selon l'invention ;
- détecter la présence dudit anticorps, indicatrice de la présence du

polypeptide NEP II.

Par "anticorps détectable", on entend soit un anticorps marqué par un groupement détectable, tel qu'un groupement radioactif, enzymatique, fluorogène ou fluorescent, etc., soit un anticorps auquel se lie un autre anticorps
 5 lui-même marqué de manière détectable.

Les anticorps selon l'invention peuvent ainsi permettre d'évaluer une surexpression du polypeptide II, qui peut être indicatrice de cellules tumorales neuroendocriniennes notamment.

10 L'invention a également pour objet un procédé d'identification de composés substrats du polypeptide NEP II tel que défini précédemment, dans lequel on met en contact lesdits composés, éventuellement marqués, avec le polypeptide NEP II, et on évalue la coupure desdits composés par NEP II, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II envers lesdits composés
 15 substrats.

De tels substrats spécifiques de NEP II peuvent être en particulier utilisés dans un procédé de détection de l'activité métalloprotéasique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

20 - mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu selon l'invention, ledit composé substrat étant éventuellement marqué ;

- évaluer la coupure dudit composé substrat, indicatrice de l'activité
 25 métalloprotéasique de NEP II.

Les cellules susceptibles d'être ainsi testées sont notamment les cellules transfectées par un polynucléotide codant pour le polypeptide NEP II tel que défini précédemment. Les extraits tissulaires susceptibles d'être testés sont en particulier les membranes de testicule, particulièrement riches en
 30 métalloprotéase NEP II.

L'invention a par ailleurs pour objet un procédé de criblage de composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique du polypeptide

NEP II selon l'invention, dans lequel on met en contact lesdits composés avec ledit polypeptide NEP II et on évalue le taux d'inhibition de l'activité métalloprotéasique de NEP II.

Les composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique de NEP II sont de préférence des peptides courts de 2 ou 3 acides aminés naturels ou modifiés.

Les peptides synthétiques identifiés comme inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II par ce procédé de criblage peuvent être couplés à un groupe chélateur de zinc tels que les groupes thiol, phosphate ou acide hydroxamique, selon les techniques classiques connues de l'homme du métier. Le composé inhibiteur obtenu est un bon candidat en tant que principe actif d'un médicament, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ledit groupe chélateur peut éventuellement être protégé de manière transitoire, par exemple par un ester de thiol, pour améliorer la biodisponibilité dudit principe actif.

Le polypeptide NEP II selon l'invention est particulièrement utile pour le criblage de composés inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II utiles pour la fabrication de médicament destiné à traiter les troubles impliquant les transmissions peptidergiques auxquelles participe NEP II.

Parmi les troubles en cause, on peut citer notamment les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, les troubles de la croissance d'origine endocrinienne, les perturbations de l'axe hypothalamo-hypophysaire et les affections endocriniennes.

Les composés substrats de NEP II ou inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II obtenus selon les procédés décrits précédemment peuvent également être utiles pour détecter la protéine NEP II.

La présente invention a donc également pour objet un procédé de détection de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu tel que défini précédemment ou avec un composé inhibiteur de l'activité

métalloprotéasique de NEP II obtenu selon le procédé de criblage tel que défini précédemment, ledit composé substrat ou ledit composé inhibiteur étant marqué;

- détecter la présence dudit composé substrat ou dudit composé inhibiteur, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II

Par "composé substrat marqué" ou "inhibiteur marqué", on entend un composé substrat ou un composé inhibiteur marqué de manière détectable, par exemple par un groupement radioactif, enzymatique, fluorogène ou fluorescent, etc.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter.

Exemple 1 :

Clonage de l'ADNc codant pour NEP II

Des oligonucléotides dégénérés ont été obtenus à partir de l'alignement des séquences peptidiques des enzymes ECE, NEP I et Kell et de la délimitation des zones de forte homologie.

L'ARN total de différents tissus de rat (cerveau, intestin et testicules) a été soumis à une transcription inverse (RT) et amplifié par réaction en chaîne à la polymérase (PCR), à l'aide d'une paire d'oligonucléotides dégénérés sur la région N-terminale riche en résidus cystéine :

Les séquences de ces oligonucléotides dégénérés sont les suivantes :

DCYS2 CCC AAG (G/T)CG (A/G)G(A/G) CTG GTC

DCYS3 T(A/T)(C/T) GC(A/C/T/G) GG(A/T) GG(A/C) TGG

Ceci a permis d'amplifier un fragment de 420 paires de bases à partir de l'ARNt de testicule codant pour une phase ouverte de lecture qui présente une homologie de 76% avec la protéine NEP I. Cette séquence a été complétée par 3' et 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends), à partir d'ARNt de cerveau et de testicules. Les séquences ont été confirmées par la vérification de cinq clones différents pour chaque tissu et chaque amplification. L'ADNc complet (SEQ ID n° 1) a alors été cloné dans les vecteurs PCR2.1 et pcDNA3.1 (Invitrogen).

Exemple 2 :**Caractéristiques du polypeptide NEP II**

Le nouveau gène isolé code pour une protéine de 774 acides aminés (SEQ ID n° 2) qui, outre de fortes homologies avec les enzymes NEP I, ECE et Kell (52%, 40% et 28% d'identité en acides aminés, respectivement) possède la séquence consensus du site actif HEXXH, une région transmembranaire (acides aminés 24 à 40 sur la séquence SEQ ID n° 2) suivie de quatre résidus cystéine caractéristiques de cette famille, et sept sites potentiels de glycosylation. Trois épissages alternatifs ont été identifiés par séquençage des RACE et par RT-PCR. Un de ces épissages alternatifs élimine un site potentiel de glycosylation et pourrait affecter le transit de la protéine à la surface de la cellule ou son activité. Chaque épissage correspond par ailleurs à un exon de la NEP I, ce qui suggère une structure de gène similaire. Ces données démontrent une appartenance de cette nouvelle enzyme à la famille des métalloprotéases ECE/NEP/Kell. Son homologie marquante avec NEP I a conduit à la nommer NEP II.

Exemple 3 :**Expression tissulaire de NEP II**

Des études de Northern-blot et de RT-PCR montrent que NEP II est codé par un transcrit de 2,8 Kb très fortement exprimé dans les testicules de rat et, modérément, dans le coeur, le foie, le système digestif et le cerveau. Des études de RT-PCR semi-quantitatives montrent un profil d'expression similaire dans ces tissus ainsi qu'une prédominance des formes longues.

Toutes ces caractéristiques indiquent clairement que la protéine identifiée pour la première fois est une métalloprotéase membranaire (ectoprotéase) responsable du métabolisme de peptides messagers neuronaux et/ou hormonaux.

Le polypeptide NEP II natif est exprimé de manière hétérogène dans le système nerveux, les glandes (hypophyse, testicule), l'appareil digestif (intestin grêle notamment), l'appareil cardiovasculaire (coeur notamment).

Ces localisations indiquent sa participation dans la protéolyse d'hormones et de neurotransmetteurs peptidergiques ou de leurs précurseurs émanant de ou agissant sur ces divers organes. Il devient dès lors intéressant dans un but thérapeutique d'affecter les transmissions peptidergiques correspondantes en inhibitant NEP II.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75013

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Nouvelle métalloprotéase NEPII

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 19

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2765 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Rattus rattus

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 107..2428

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCAAAGCACT AGCTTCAGTG TGCTCAAGGC ATCCAAGCTC CAGCTGCCTC CCTCCTGGCC	60
CTGGCCCTGG GTGCTCAGCT GTGTGCCTTC CACCCAGAAC CGGCTG ATG GGG AAG	115
	Met Gly Lys
	1
TCG GAG AGC TCA GTG GGG ATG ATG GAG AGA GCG GAC AAC TGT GGG AGG	163
Ser Glu Ser Ser Val Gly Met Met Glu Arg Ala Asp Asn Cys Gly Arg	
5	10
	15

AGG CGC CTA GGC TTC GTG GAG TGT GGG CTG CTG GTA CTG CTG ACA CTG Arg Arg Leu Gly Phe Val Glu Cys Gly Leu Leu Val Leu Leu Thr Leu 20 25 30 35	211
CTG TTG ATG GGA GCC ATA GTG ACT CTG GGT GTC TTC TAC AGC ATA GGG Leu Leu Met Gly Ala Ile Val Thr Leu Gly Val Phe Tyr Ser Ile Gly 40 45 50	259
AAG CAG CTG CCC CTC TTA AAT AGC CTG CTG CAC GTC TCC CGG CAT GAG Lys Gln Leu Pro Leu Leu Asn Ser Leu Leu His Val Ser Arg His Glu 55 60 65	307
AGG ACG GTT GTA AAA CGA GTC CTC AGA GAT TCA TCG CAG AAG AGT GAC Arg Thr Val Val Lys Arg Val Leu Arg Asp Ser Ser Gln Lys Ser Asp 70 75 80	355
ATC TGT ACT ACC CCA AGC TGC GTG ATA GCA GCT GCC AGA ATC CTC CAG Ile Cys Thr Thr Pro Ser Cys Val Ile Ala Ala Ala Arg Ile Leu Gln 85 90 95	403
AAC ATG GAC CAG TCA AAG AAA CCC TGC GAC AAC TTC TAT CAG TAT GCT Asn Met Asp Gln Ser Lys Lys Pro Cys Asp Asn Phe Tyr Gln Tyr Ala 100 105 110 115	451
TGC GGA GGC TGG CTA CGG CAC CAT GTG ATC CCC GAG ACC AAC TCC AGA Cys Gly Gly Trp Leu Arg His His Val Ile Pro Glu Thr Asn Ser Arg 120 125 130	499
TAC AGC GTC TTT GAC ATC CTT CGG GAT GAG CTG GAG GTC ATC CTC AAA Tyr Ser Val Phe Asp Ile Leu Arg Asp Glu Leu Glu Val Ile Leu Lys 135 140 145	547
GGG GTG CTG GAG GAT TCC TCT GTC CAG CAC CGC CCA GCT GTG GAG AAG Gly Val Leu Glu Asp Ser Ser Val Gln His Arg Pro Ala Val Glu Lys 150 155 160	595
GCC AAG ACA CTG TAC CGC TCC TGC ATG AAC CAG AGT GTG ATA GAG AAG Ala Lys Thr Leu Tyr Arg Ser Cys Met Asn Gln Ser Val Ile Glu Lys 165 170 175	643
AGA GAC TCT GAG CCC CTG CTG AAC GTC TTA GAT ATG ATA GGA GGT TGG Arg Asp Ser Glu Pro Leu Leu Asn Val Leu Asp Met Ile Gly Gly Trp 180 185 190 195	691
CCT GTA GCC ATG GAC AAG TGG AAT GAG ACC ATG GGC CCC AAG TGG GAA Pro Val Ala Met Asp Lys Trp Asn Glu Thr Met Gly Pro Lys Trp Glu 200 205 210	739
CTG GAG CGG CAG TTG GCT GTG TTG AAC TCG CAG TTC AAC AGG CGC GTC Leu Glu Arg Gln Leu Ala Val Leu Asn Ser Gln Phe Asn Arg Arg Val 215 220 225	787

CTC ATC GAC CTC TTC ATC TGG AAT GAT GAC CAG AAC TCC AGC CGG CAC Leu Ile Asp Leu Phe Ile Trp Asn Asp Asp Gln Asn Ser Ser Arg His 230 235 240	835
GTC ATC TAC ATA GAC CAG CCC ACC TTG GGC ATG CCC TCC CGG GAG TAC Val Ile Tyr Ile Asp Gln Pro Thr Leu Gly Met Pro Ser Arg Glu Tyr 245 250 255	883
TAT TTC AAG GAA GAC AGC CAC CGG GTA CGG GAA GCC TAC CTG CAG TTC Tyr Phe Lys Glu Asp Ser His Arg Val Arg Glu Ala Tyr Leu Gln Phe 260 265 270 275	931
ATG ACA TCA GTG GCC ACT ATG CTG AGG AGA GAC CTG AAC CTG CCC GGG Met Thr Ser Val Ala Thr Met Leu Arg Arg Asp Leu Asn Leu Pro Gly 280 285 290	979
GAG ACC GAT TTG GTG CAG GAG GAA ATG GCA CAG GTG CTG CAT CTG GAG Glu Thr Asp Leu Val Gln Glu Glu Met Ala Gln Val Leu His Leu Glu 295 300 305	1027
ACA CAT CTG GCC AAC GCC ACG GTC CCC CAG GAG AAA AGG CAT GAT GTC Thr His Leu Ala Asn Ala Thr Val Pro Gln Glu Lys Arg His Asp Val 310 315 320	1075
ACC GCC CTG TAT CAC CGA ATG GGC CTG GAG GAG CTG CAG GAA AGG TTT Thr Ala Leu Tyr His Arg Met Gly Leu Glu Glu Leu Gln Glu Arg Phe 325 330 335	1123
GGT CTG AAG GGG TTT AAC TGG ACT CTC TTC ATA CAA AAC GTG CTG TCT Gly Leu Lys Gly Phe Asn Trp Thr Leu Phe Ile Gln Asn Val Leu Ser 340 345 350 355	1171
TCT GTG CAA GTT GAG CTG CTC CCG AAT GAG GAG GTG GTG GTC TAT GGC Ser Val Gln Val Glu Leu Leu Pro Asn Glu Glu Val Val Val Tyr Gly 360 365 370	1219
ATC CCC TAC CTG GAG AAT CTT GAG GAG ATC ATT GAC GTC TTC CCA GCA Ile Pro Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Glu Ile Ile Asp Val Phe Pro Ala 375 380 385	1267
CAG ACC TTG CAA AAC TAC CTG GTG TGG CGC CTG GTG CTA GAT CGC ATC Gln Thr Leu Gln Asn Tyr Leu Val Trp Arg Leu Val Leu Asp Arg Ile 390 395 400	1315
GGC AGC CTG AGC CAG AGA TTC AAA GAA GCG CGT GTG GAC TAC CGC AAG Gly Ser Leu Ser Gln Arg Phe Lys Glu Ala Arg Val Asp Tyr Arg Lys 405 410 415	1363
GCG CTG TAC GGT ACA ACC ATG GAG GAA GTA CGC TGG CGG GAG TGT GTC Ala Leu Tyr Gly Thr Thr Met Glu Glu Val Arg Trp Arg Glu Cys Val 420 425 430 435	1411
AGC TAT GTC AAC AGC AAC ATG GAG AGT GCC GTG GGC TCC CTC TAC ATC	1459

Ser Tyr Val Asn Ser Asn Met Glu Ser Ala Val Gly Ser Leu Tyr Ile	
440 445 450	
AAG CGG GCC TTC TCC AAG GAC AGC AAG AGC ATA GTC AGT GAG CTT ATC	1507
Lys Arg Ala Phe Ser Lys Asp Ser Lys Ser Ile Val Ser Glu Leu Ile	
455 460 465	
GAG AAG ATA CGG TCC GTG TTT GTG GAT AAC CTG GAC GAG TTG AAC TGG	1555
Glu Lys Ile Arg Ser Val Phe Val Asp Asn Leu Asp Glu Leu Asn Trp	
470 475 480	
ATG GAT GAG GAA TCC AAG AAA AAG GCC CAG GAA AAG GCC TTG AAT ATC	1603
Met Asp Glu Glu Ser Lys Lys Lys Ala Gln Glu Lys Ala Leu Asn Ile	
485 490 495	
CGG GAA CAG ATC GGC TAC CCT GAC TAC ATT TTG GAA GAC AAT AAC AGA	1651
Arg Glu Gln Ile Gly Tyr Pro Asp Tyr Ile Leu Glu Asp Asn Asn Arg	
500 505 510 515	
CAC CTG GAT GAG GAA TAC TCC AGT CTG ACT TTC TCA GAG GAC CTG TAT	1699
His Leu Asp Glu Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Phe Ser Glu Asp Leu Tyr	
520 525 530	
TTT GAG AAC GGG CTT CAG AAC CTC AAG AAC AAT GCC CAA AGG AGC CTC	1747
Phe Glu Asn Gly Leu Gln Asn Leu Lys Asn Asn Ala Gln Arg Ser Leu	
535 540 545	
AAG AAA CTT CGG GAA AAG GTG GAC CAG AAT CTC TGG ATC ATT GGG GCT	1795
Lys Lys Leu Arg Glu Lys Val Asp Gln Asn Leu Trp Ile Ile Gly Ala	
550 555 560	
GCA GTG GTC AAT GCA TTC TAC TCC CCA AAC AGA AAC CTG ATC GTC TTT	1843
Ala Val Val Asn Ala Phe Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Leu Ile Val Phe	
565 570 575	
CCA GCG GGG ATC CTC CAG CCA CCC TTC TTC AGC AAG GAC CAA CCA CAG	1891
Pro Ala Gly Ile Leu Gln Pro Pro Phe Phe Ser Lys Asp Gln Pro Gln	
580 585 590 595	
GCC TTG AAT TTC GGG GGC ATC GGG ATG GTG ATT GGA CAC GAG ATC ACA	1939
Ala Leu Asn Phe Gly Gly Ile Gly Met Val Ile Gly His Glu Ile Thr	
600 605 610	
CAC GGC TTT GAT GAT AAC GGT CGG AAC TTT GAC AAG AAT GGC AAC ATG	1987
His Gly Phe Asp Asp Asn Gly Arg Asn Phe Asp Lys Asn Gly Asn Met	
615 620 625	
CTG GAC TGG TGG AGC AAC TTC TCG GCC CGG CAC TTC CGA CAG CAG TCA	2035
Leu Asp Trp Trp Ser Asn Phe Ser Ala Arg His Phe Arg Gln Gln Ser	
630 635 640	
CAG TGT ATG ATT TAT CAG TAC AGC AAC TTC TCT TGG GAA CTA GCA GAC	2083
Gln Cys Met Ile Tyr Gln Tyr Ser Asn Phe Ser Trp Glu Leu Ala Asp	

645	650	655	
AAC CAG AAT GTG AAC GGA TTC AGC ACC CTC GGG GAG AAC ATC GCC GAC Asn Gln Asn Val Asn Gly Phe Ser Thr Leu Gly Glu Asn Ile Ala Asp 660 665 670 675			2131
AAC GGC GGT GTG CGG CAG GCA TAC AAG GCT TAC CTA CAG TGG CTA GCT Asn Gly Gly Val Arg Gln Ala Tyr Lys Ala Tyr Leu Gln Trp Leu Ala 680 685 690			2179
GAA GGC GGC AGA GAC CAG AGA CTG CCG GGA CTG AAC CTG ACC TAT GCT Glu Gly Gly Arg Asp Gln Arg Leu Pro Gly Leu Asn Leu Thr Tyr Ala 695 700 705			2227
CAG CTT TTC TTC ATT AAC TAT GCC CAG GTG TGG TGT GGG TCC TAC AGG Gln Leu Phe Phe Ile Asn Tyr Ala Gln Val Trp Cys Gly Ser Tyr Arg 710 715 720			2275
CCG GAG TTC GCC ATC CAG TCC ATC AAG ACA GAT GTC CAC AGT CCT CTT Pro Glu Phe Ala Ile Gln Ser Ile Lys Thr Asp Val His Ser Pro Leu 725 730 735			2323
AAG TAC AGG GTG CTG GGC TCA CTA CAG AAC CTA CCA GGC TTC TCT GAG Lys Tyr Arg Val Leu Gly Ser Leu Gln Asn Leu Pro Gly Phe Ser Glu 740 745 750 755			2371
GCG TTC CAC TGC CCA CGA GGC AGC CCC ATG CAC CCT ATG AAT CGA TGT Ala Phe His Cys Pro Arg Gly Ser Pro Met His Pro Met Asn Arg Cys 760 765 770			2419
CGC ATC TGG TAGCCAAGGC TGAGCTATGC TCGGGCCAC GCCCCGCCAC Arg Ile Trp			2468
CCAGAGGCTT CGTGAATGGT GTAGCCGGCA TAGATGTGCA GGTGTTGCC TGAAGGCCAC			2528
TGGAGCCACC AGCCAGCCCT CCGCGCCCGC CCTAGAGGGC AGCCACCCGC CCACATCTGG			2588
GATGAGTGGT GGTGCCTGGT CCTGCGCCTT TTCCGGCCAG TGAGGGTCAG CGGCCCCGTA			2648
GGAGCAGTCA GCTGTCCCCC ACCCTCTTCA TAGTGTGTGG CTAAATGTCC TCGAGCTTCA			2708
GACTTGAGCT AAGTAAACGC TTCAAAGAAG GCAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGGG			2765

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 774 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Lys Ser Glu Ser Ser Val Gly Met Met Glu Arg Ala Asp Asn
 1 5 10 15
 Cys Gly Arg Arg Arg Leu Gly Phe Val Glu Cys Gly Leu Leu Val Leu
 20 25 30
 Leu Thr Leu Leu Leu Met Gly Ala Ile Val Thr Leu Gly Val Phe Tyr
 35 40 45
 Ser Ile Gly Lys Gln Leu Pro Leu Leu Asn Ser Leu Leu His Val Ser
 50 55 60
 Arg His Glu Arg Thr Val Val Lys Arg Val Leu Arg Asp Ser Ser Gln
 65 70 75 80
 Lys Ser Asp Ile Cys Thr Thr Pro Ser Cys Val Ile Ala Ala Ala Arg
 85 90 95
 Ile Leu Gln Asn Met Asp Gln Ser Lys Lys Pro Cys Asp Asn Phe Tyr
 100 105 110
 Gln Tyr Ala Cys Gly Gly Trp Leu Arg His His Val Ile Pro Glu Thr
 115 120 125
 Asn Ser Arg Tyr Ser Val Phe Asp Ile Leu Arg Asp Glu Leu Glu Val
 130 135 140
 Ile Leu Lys Gly Val Leu Glu Asp Ser Ser Val Gln His Arg Pro Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Lys Ala Lys Thr Leu Tyr Arg Ser Cys Met Asn Gln Ser Val
 165 170 175
 Ile Glu Lys Arg Asp Ser Glu Pro Leu Leu Asn Val Leu Asp Met Ile
 180 185 190
 Gly Gly Trp Pro Val Ala Met Asp Lys Trp Asn Glu Thr Met Gly Pro
 195 200 205
 Lys Trp Glu Leu Glu Arg Gln Leu Ala Val Leu Asn Ser Gln Phe Asn
 210 215 220
 Arg Arg Val Leu Ile Asp Leu Phe Ile Trp Asn Asp Asp Gln Asn Ser
 225 230 235 240
 Ser Arg His Val Ile Tyr Ile Asp Gln Pro Thr Leu Gly Met Pro Ser
 245 250 255
 Arg Glu Tyr Tyr Phe Lys Glu Asp Ser His Arg Val Arg Glu Ala Tyr
 260 265 270

Leu Gln Phe Met Thr Ser Val Ala Thr Met Leu Arg Arg Asp Leu Asn
 275 280 285
 Leu Pro Gly Glu Thr Asp Leu Val Gln Glu Glu Met Ala Gln Val Leu
 290 295 300
 His Leu Glu Thr His Leu Ala Asn Ala Thr Val Pro Gln Glu Lys Arg
 305 310 315 320
 His Asp Val Thr Ala Leu Tyr His Arg Met Gly Leu Glu Glu Leu Gln
 325 330 335
 Glu Arg Phe Gly Leu Lys Gly Phe Asn Trp Thr Leu Phe Ile Gln Asn
 340 345 350
 Val Leu Ser Ser Val Gln Val Glu Leu Leu Pro Asn Glu Glu Val Val
 355 360 365
 Val Tyr Gly Ile Pro Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Glu Ile Ile Asp Val
 370 375 380
 Phe Pro Ala Gln Thr Leu Gln Asn Tyr Leu Val Trp Arg Leu Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gln Arg Phe Lys Glu Ala Arg Val Asp
 405 410 415
 Tyr Arg Lys Ala Leu Tyr Gly Thr Thr Met Glu Glu Val Arg Trp Arg
 420 425 430
 Glu Cys Val Ser Tyr Val Asn Ser Asn Met Glu Ser Ala Val Gly Ser
 435 440 445
 Leu Tyr Ile Lys Arg Ala Phe Ser Lys Asp Ser Lys Ser Ile Val Ser
 450 455 460
 Glu Leu Ile Glu Lys Ile Arg Ser Val Phe Val Asp Asn Leu Asp Glu
 465 470 475 480
 Leu Asn Trp Met Asp Glu Glu Ser Lys Lys Lys Ala Gln Glu Lys Ala
 485 490 495
 Leu Asn Ile Arg Glu Gln Ile Gly Tyr Pro Asp Tyr Ile Leu Glu Asp
 500 505 510
 Asn Asn Arg His Leu Asp Glu Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Phe Ser Glu
 515 520 525
 Asp Leu Tyr Phe Glu Asn Gly Leu Gln Asn Leu Lys Asn Asn Ala Gln
 530 535 540
 Arg Ser Leu Lys Lys Leu Arg Glu Lys Val Asp Gln Asn Leu Trp Ile

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TGGAGCGGCA GTTGGCTGTG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4 :

AGTTCCCACT TGGGGCCCAT G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GCTGGAGGAT TCCTCTGTCC

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CGGGGATCAC ATGGTGCCG

19

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7 :

CTACCCCAAG CTGCGTGATA G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8 :

CGGCACCATG TGATCCCCGA G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9 :

GCAAAGCACT AGCTTCAGTG TG

22

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GGTCATCATT CCAGATGAAG AG

22

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11 :

CGATGAGGAC GCGCCTGTTG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

TGCAGGAAAG GTTGGTCTG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GAACGCCTCA GAGAAGCCTG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

ATGACCAGAA CTCCAGCCGG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CATCATGCTT TTTCTCCTGG G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16 :

CCCGAAGTTT CTTGAGGCTC C

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17 :

GATCGGCTAC CCTGACTAC

19

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18 :

GTTCGCCATC CAGTCCATC

19

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: sonde oligonucléotidique

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

CGAAGCCTAG GCGCCTCCTC

20

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé dont la séquence d'acides aminés est choisie parmi la
 5 séquence SEQ ID n°2, une séquence dérivée ou homologue de ladite
 séquence SEQ ID n°2, ou un fragment biologiquement actif de ladite
 séquence SEQ ID n°2, ledit polypeptide isolé étant désigné par «NEP II ».
2. Séquence nucléotidique isolée comprenant une séquence choisie parmi la
 10 séquence SEQ ID n°1, une séquence dérivée ou homologue de ladite
 séquence SEQ ID n°1, ou leurs séquences complémentaires.
3. Sonde oligonucléotidique hybridant spécifiquement avec la séquence
 nucléotidique selon la revendication 2, ladite sonde ayant une séquence
 d'acides aminés choisie parmi :
 - SEQ-ID n°3 ;
 - 15 - SEQ ID n°4 ;
 - SEQ ID n°5 ;
 - SEQ ID n°6 ;
 - SEQ ID n°7 ;
 - SEQ ID n°8 ;
 - 20 - SEQ ID n°9 ;
 - SEQ ID n°10 ;
 - SEQ ID n°11 ;
 - SEQ ID n°12 ;
 - SEQ ID n°13 ;
 - 25 - SEQ ID n°14 ;
 - SEQ ID n°15 ;
 - SEQ ID n°16 ;
 - SEQ ID n°17 ;
 - SEQ ID n°18 ;
 - 30 - SEQ ID n°19 .
4. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence
 nucléotidique selon la revendication 2.
5. Cellule hôte transfectée par un vecteur selon la revendication 4.

6. Anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'un polypeptide selon la revendication 1 administré à un animal, et sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon la revendication 1.
- 5 7. Procédé de détection immunologique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :
 - mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un anticorps détectable selon la revendication 6 ;
 - 10 - détecter la présence dudit anticorps, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II.
8. Procédé de détection de l'expression du polypeptide NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à :
 - 15 - préparer l'ARN dudit échantillon ou desdites cellules ou dudit tissu;
 - mettre en contact ledit ARN obtenu avec au moins une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique selon la revendication 2, ladite sonde pouvant être
 - 20 notamment une sonde oligonucléotidique selon la revendication 3 ;
 - détecter la présence d'ARNm hybridant avec ladite sonde, indicatrice de l'expression du polypeptide NEP II.
9. Procédé d'identification de composés substrats du polypeptide NEP II selon la revendication 1, dans lequel on met en contact lesdits composés,
 - 25 éventuellement marqués, avec le polypeptide NEP II, et on évalue la coupure desdits composés par NEP II, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II envers lesdits composés substrats.
10. Procédé de détection de l'activité métalloprotéasique de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu
 - 30 comprenant les étapes consistant à :
 - mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II

obtenu selon le procédé de la revendication 9, ledit composé substrat étant éventuellement marqué ;

- évaluer la coupure dudit composé substrat, indicatrice de l'activité métalloprotéasique de NEP II.

5 11. Procédé de criblage de composés susceptibles d'inhiber l'activité métalloprotéasique du polypeptide NEP II selon la revendication 1, dans lequel on met en contact lesdits composés avec ledit polypeptide NEP II et on évalue le taux d'inhibition de l'activité métalloprotéasique de NEP II.

10 12. Procédé de détection de NEP II dans un échantillon cellulaire ou tissulaire ou dans des cellules ou un tissu comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit échantillon cellulaire ou tissulaire, lesdites cellules ou ledit tissu avec un composé substrat du polypeptide NEP II obtenu selon le procédé de la revendication 9 ou avec un composé inhibiteur de l'activité métalloprotéasique de NEP II obtenu selon le procédé de criblage de la
15 revendication 11, ledit composé substrat ou ledit composé inhibiteur étant marqué ;

- détecter la présence dudit composé substrat ou dudit composé inhibiteur, indicatrice de la présence du polypeptide NEP II.

20 13. Utilisation du polypeptide NEP II selon la revendication 1 pour le criblage de composés inhibiteurs de l'activité métalloprotéasique de NEP II utiles pour la fabrication de médicament destiné à traiter les troubles impliquant les transmissions peptidergiques auxquelles participe NEP II.

25 14. Utilisation selon la revendication 13 dans laquelle lesdits troubles sont choisis parmi les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, les troubles de la croissance d'origine endocrinienne, les perturbations de l'axe hypothalamo-hypophysaire et les affection endocriniennes.

THIS PAGE BLANK (USPTO)